

UNTERSUCHUNGEN ZUR
HOCHSPANNUNGSELEKTROPHORESE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
zu
MÜNCHEN

vorgelegt
von
Ludwig Baumgartner
aus
Saal/Donau

Dezember 1957



Berichterstatter: 1. Prof.Dr.W. Graßmann
2. Prof.Dr.G.M. Schwab

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 1958

Die Papierelektrophorese ist ein Hilfsmittel zur qualitativen und quantitativen Analyse von Substanzgemischen und bedient sich dabei der unterschiedlichen Beweglichkeit der Komponenten im elektrischen Feld. Während sich bei der sogenannten Niedervoltelektrophorese der Papierstreifen, der das zu trennende Substanzgemisch aufnimmt, freihängend in einer Feuchtigkeitsatmosphäre befindet, wobei Feldstärken von 3 - 5 V/cm verwendet werden, muß bei der Hochspannungselektrophorese auf Grund der u.U. ziemlich beträchtlichen Erhöhung der Feldstärken von 20 bis 200 V/cm und der damit verbundenen quadratisch ansteigenden Stromwärme Q ($Q = c \cdot u^2/R$; c = kalorisches Wärmeäquivalent, 0,24 cal/Watt; u = Spannung; R = Widerstand des mit Puffer getränkten Papierstreifens) der Elektrophoresestreifen wirksam gekühlt werden. Die hervorstechenden Vorteile der Hochspannungselektrophorese gegenüber der apparativ viel einfacher durchzuführenden Niedervoltelektrophorese liegen in der Herabsetzung der Trennzeit und der damit verbundenen Verminderung der zeitabhängigen Diffusion und Erzielung schärferer und besserer Trennergebnisse. Allerdings ist der apparative Aufwand ziemlich groß, wobei noch zusätzlich eine kompliziertere Handhabung in Kauf genommen werden muß.

Die Abführung der Jouleschen Wärme geschieht bisher auf zwei Arten:

1. Die Methode der Kühlung des Elektrophoresestreifens mit organischen, apolaren Lösungsmitteln nach Michl (1); die Wärmeabfuhr erfolgt hierbei durch Leitung und Konvektion. Als Kühlmittel kamen bisher zur Anwendung in der Hauptsache Toluol (1), daneben Hexan (2), Heptan, Chlorbenzol (3) und Tetrachlorkohlenstoff (4). In letzterer Zeit wurde auch ein Silikonöl niedriger Viscosität vorgeschlagen, das den Vorteil der Unbrennbarkeit und Geruchlosigkeit besitzt (5).
2. Die Methode der entweder einseitigen (6) oder beidseitigen (7) Kühlung des Elektrophoresestreifens mit Festkörpern; die Wärmeabfuhr geschieht hier nur durch Leitung. Als Festkörper wurden zuerst (8) Kupferplatten mit entsprechender Isolierung gegen den Streifen beschrieben. Besser eignen sich wohl Glasplatten (9), die von Kühlsole unterspült werden oder Kunststoffplatten (10) oder mit Lack-Nylonschichten überzogene Aluminiumplatten (11).

Die Hochspannungselektrophorese hat in der Zwischenzeit ein großes Anwendungsfeld bei der Untersuchung der verschiedensten Substanzen gefunden, so bei der Untersuchung von Aminosäuren (12), ~~Pep-~~ **ptiden** (13), Nichtproteinstickstoff (14), Nucleotiten (15), Purinen (16), Indolderivaten (17), Zuckern (18), org. Säuren (19), Phenolen (20), Cholinestern (21), Suchtmitteln (22) und anorg. Ionen (23). Dagegen scheint sie sich in Bezug auf makromolekulare Stoffe, wie Proteine, langkettige Peptide, Polysaccharide und Nucleinsäuren bis jetzt nicht bewährt zu haben (24). Dagegen ist die Trennung von Proteinen in dünnen Stärkeschichten als Trägermaterial selbst bei Spannungsdifferenzen von 20-50 V/cm noch möglich (25).

Trotz der erzielten Erfolge sind die bisherigen Methoden der Hochspannungselektrophorese doch mit einigen sehr bemerkenswerten Nachteilen behaftet, die zwar in Kauf genommen werden müssen, aber das Arbeiten und die Ergebnisse sehr beeinträchtigen. Bezüglich der Verwendung von org. Lösungsmitteln als Kühlflüssigkeit müssen vor allem gewisse Vorsichtsmaßregeln wegen der leichten Entflammbarkeit eingehalten werden. Außerdem ist das Arbeiten mit diesen leicht flüchtigen Lösungsmitteln ziemlich unangenehm. Bei der Wahl des Puffers muß darauf geachtet werden, daß er in der Kühlflüssigkeit nicht löslich ist. Trotzdem kann nicht verhindert werden, daß sich kleine Anteile aus der Pufferlösung darin lösen, so daß das Kühlmittel nach einiger Zeit erneuert werden muß. Bei der Untersuchung von unbekannten Substanzgemischen kann die Löslichkeit von Komponenten im Kühlmittel Anlaß zu Substanzverlusten oder gar gänzlicher Extraktion geben, so daß solche Stoffe dem Nachweis entzogen sind.

Bei der Festkörper-Kühlung eignen sich noch am besten Glasplatten, die immerhin noch eine genügend große Wärmeleitfähigkeit besitzen. Als großer Nachteil muß aber die schwierige Verarbeitungsmöglichkeit, ferner die Empfindlichkeit gegenüber Druck oder Schlag in Betracht gezogen werden. Die Verwendung von Kunststoffkühlern vermeidet zwar einige Nachteile der Kühlung mit Glasplatten, weist aber andererseits infolge der schlechten Wärmeleitfähigkeit, der Möglichkeit der Aufwölbung der Platte auf Grund von Stauungen der Kühlflüssigkeit, der Bildung von Rillen und Verkohlungen infolge Funkenbildung einige sehr unangenehme Eigen-

schaften auf. Besonders die Aufwölbung hat zur Folge, daß der Streifen nicht auf seiner ganzen Länge gleichmäßig aufliegt, so daß ein örtliches Abdampfen vom Puffer und damit Austrocknen des Streifens nicht zu verhindern ist. Bei Metallplattenkühlern liegt die Hauptschwierigkeit in einer geeigneten Isolierung gegenüber dem Streifen. Am besten scheint sich hierzu das Zwischenlegen von Polyäthylen-Folien zu eignen.

Beiden Kühlarten, gleichgültig, ob es sich um Kühlung mit Flüssigkeiten oder Festkörpern handelt, ist ein Effekt gemeinsam, der sich auf Grund der Berührung des Streifens mit der Kühlphase ergibt, nämlich das Auftreten von Unregelmäßigkeiten hinsichtlich der Feuchtigkeit und Kühlung des Streifens. Die Störungen, die sich daraus für den Ablauf des Elektrophoreseversuches ergeben können, faßt man heute unter der Bezeichnung "Zonenimperfektion" zusammen. Diese äußert sich darin, daß eine anfangs gerade Zone nach Durchwanderung einer gewissen Strecke gewinkelt oder geschlängelt erscheint oder daß sich, besonders bei Auftragung größerer Substanzmengen, an der Rückseite tröpfchenförmige Verformungen ausbilden. Diese Erscheinungen beruhen fast immer auf irgendwelchen Unvollkommenheiten der experimentellen Bedingungen, wie z.B. ungleiche Kühlung des Streifens, wodurch örtliche Unterschiede der Feuchtigkeit im Streifen und damit auch der Feldstärke auftreten. Auf Grund dieser Effekte ist auch eine quantitative Auswertung des Auftrennergebnisses - im Gegensatz zur Elektrophorese mit freihängendem Streifen - nicht gut möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode der Hochspannungselektrophorese untersucht, die durch Anwendung eines völlig freihängenden Streifens die Nachteile der anderen Hochspannungsmethoden, insbesondere die für die quantitative Auswertung von Pherogrammen besonders störende Zonenimperfektion, vermeiden sollte. Dazu wurde der Streifen auf der einen Seite mittels einer in geringem Abstand davon befindlichen Kühlfläche durch Strahlung und Konvektion auf niedriger Temperatur gehalten. Auf der andern Seite wurde dem Streifen nach Maß der erfolgten Verdunstung infolge der Joule'schen Wärme Flüssigkeit bzw. Puffer-

lösung aufgedampft. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, war es auf diese Weise unter Einhaltung optimaler Bedingungen möglich, ein Gleichgewicht zwischen Verdunstung von Feuchtigkeit am Streifen und Aufbringen neuer Feuchtigkeit zu erreichen. Es zeigt sich ferner, daß unter optimalen Bedingungen bei Feldstärken bis 30 V/cm einwandfreie Trennungen erzielbar sind, welche hinsichtlich der Trennschärfe mit denen der bisherigen Hochspannungselektrophoresemethoden vergleichbar sind, aber in Bezug auf die Zonenimperfektion weitgehend geradlinige und scharfe Zonen aufweisen, so daß auch eine direktphotometrische und damit quantitative Auswertung möglich ist.

Beschreibung der Apparatur

Die Elektrophoresekammer besteht in der Hauptsache aus 5 voneinander durch Luftspalte getrennten Bauelementen: den beiden Puffergefäßen; einer Wanne, die die Heizvorrichtung enthält und einem Festkörper-Kühlsystem (Abbildung).

Die Kammer besitzt eine Länge von 90 cm, eine Breite von 10,5 cm und eine Höhe von 10 cm. Ein Filtrierpapierstreifen F hängt innerhalb seiner ganzen Trennfläche waagerecht auf dünnen Perlonfäden Pf, die im Abstand von 4,5 cm an den beiden Verstärkungsrohren V ($\varnothing$ 1,5 cm) des Rahmens R befestigt sind. Die Enden des Streifens liegen auf 2 cm langen Auflagen Al und tauchen, auf einem Glasstab hängend, direkt in die Puffergefäße P ein. Puffergefäße P und Elektrodengefäße E (6 cm lang) sind durch ein mit Glaswolle gefülltes kurzes Glasrohr Gl verbunden. Die Elektrodengefäße enthalten in einem Labyrinthsystem Platinelektroden. Oberhalb der beiden Verstärkungsrohre V befindet sich ein Vinidurrohr A ($\varnothing$ 0,8 cm), das an der Kammerseite im Abstand von 4,5 cm 0,1 cm große Löcher enthält. Die Vinidurrohre A sind an je einem - entgegengesetztem - Ende zugeschweißt; das andere Ende ist mit einer Membranpumpe verbunden, die die Feuchtigkeitsatmosphäre zwischen Streifen und Kühlfläche in Schwingungen (ca. 3 Schwingungen/sec) versetzt, um die Konvektion und damit die Kühlwirkung zu erhöhen.

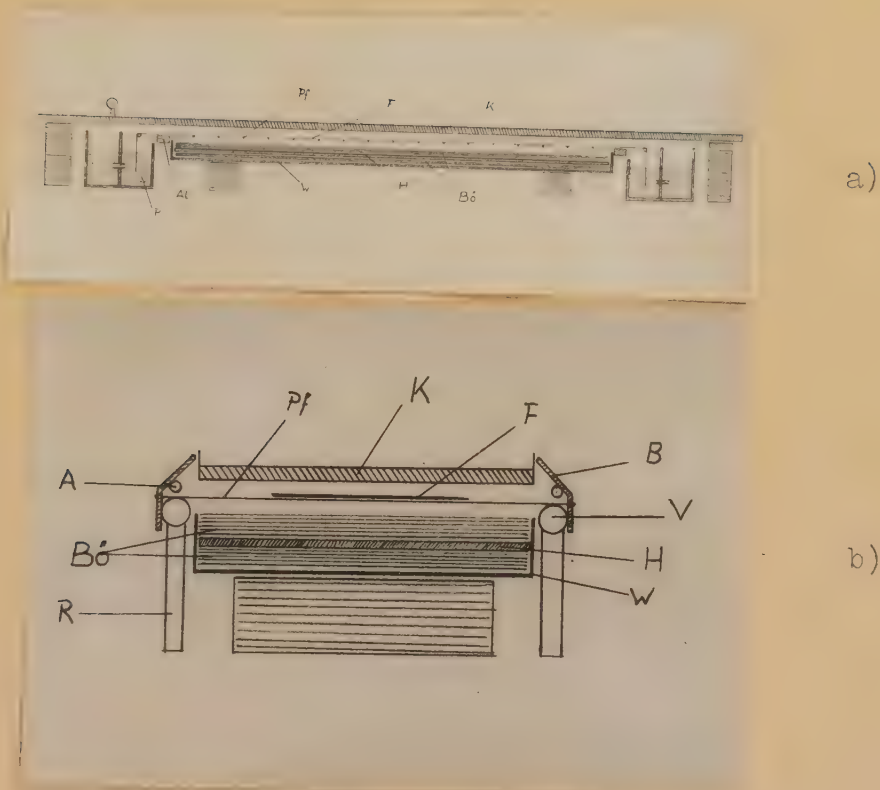


Abbildung Elektrophoresekammer

a) Längsschnitt, b) Querschnitt.

F = Streifen, Pf = Perlonfäden, Al = Auflage, P = Puffergefäß, K = Kühlplatte des Kühlers, W = Wanne, H = Heizdrähte, Bö = Filtrierpapierbögen, V = Verstärkungsrohre, A = Vinidurrohr mit Löchern, B = Blende, R = Rahmen.

Um Feuchtigkeitsverluste zu vermeiden, sind an den Verstärkungsrohren V Abdeckblenden B angebracht. Über dem Streifen befindet sich im Abstand von 1 cm eine mit Lack isolierte Kupferplatte, an die Kupferschlangen spiralenförmig angeschweißt sind. Die Kupferschlangen sind direkt in den Kreislauf eines Kühlaggregats geschaltet. Unter dem Streifen steht eine Wanne W, die durch 0,5 cm große Luftspalte vom außenliegenden Rahmen getrennt ist. Die Bodenfläche der Wanne ist mit mehreren Lagen gut saugender Filtrierpapiers Bö bedeckt. Darüber liegt eine Heizplatte H. Sie besteht aus einer Fertinaxplatte, auf der Heizdrähte einer aus-

gezogenen Kochplattenspirale angebracht sind. Die Heizplatte ist wiederum durch mehrere Schichten Filtrierpapier B6 bedeckt, so daß der Abstand zum darüber liegenden Streifen ungefähr 0,5 - 1 cm beträgt. Die Heizdrähte sind über einem Vorschaltwiderstand und einem Amperemeter am 220 V-Netz angeschaltet.

Arbeitsweise

Vor Beginn des Elektrophoreseversuches werden die Puffer- und Elektrodengefäße sowie die Wanne, die zur Aufnahme des Puffers für die Aufdampfvorrichtung dient, mit dem vorgesehenen Puffer gefüllt. Durch Inbetriebsetzung des Kühlaggregats friert der Kühler allmählich ein. Sodann werden die Enden des Heizdrahtes im Aufdampfer über einen Regelwiderstand mit dem Stromnetz verbunden. Optimale Verhältnisse ergeben sich dabei, wenn das Puffergemisch im Aufdampfer auf ca. 40°C erwärmt wird. Diese Temperatur ergibt sich unter den herrschenden Bedingungen bei einer Heizstromstärke von 1,5 A.

Nach diesen Vorbereitungen wird ein Filtrierpapierstreifen 60 x 10 cm Schleicher und Schüll, 2043 a bzw. 2043 a Mgl mit Puffer gesättigt und sodann durch eine Walzenpresse gedreht. Zweckmäßigerweise stellt man den Druck der beiden Walzen so ein, daß der Papierstreifen jeweils eine Gewichtszunahme von 110 % gegenüber dem Trockengewicht aufweist. Den auf diese Weise homogen befeuchteten Streifen legt man auf die Perlonfäden der Kammer, wobei die Enden direkt in die Puffergefäße tauchen. Die zu untersuchende Substanz trägt man mittels einer Mikropipette in Form eines Querstriches an der vorher markierten Stelle vorsichtig auf; dann schließt man die "feuchte Kammer" nach oben durch Auflegen der Kühlplatte ab und setzt gleichzeitig die Membranpumpe in Betrieb. Sobald die Kammer mit der Sicherheitshaube abgedeckt ist, wird die Spannungsquelle eingeschaltet (4 Gleichrichter-röhren Valvo 56000 in Graetzschaltung, bis 10000 V regelbar, maximal 60 mA) und auf die gewünschte Spannung geregelt. In allgemeinen wird man die Spannung so wählen, daß der Elektrophoresestrom 10 mA nicht übersteigt. Je nach der Ionenstärke des verwendeten Puffers ist die maximal erreichbare Feldstärke verschieden. Mit dem Essigsäure-Ameisensäure-Puffer pH 1,9 arbeitet man zweck-

mäßigerweise bei 25 - 30 V/cm. Die vom Aufdampfer produzierte Feuchtigkeitsmenge kann durch die Wahl beliebiger Heiztemperaturen variiert werden. Man hat es somit in der Hand, Abdampfung und Aufdampfung am Streifen aufeinander abzustimmen. Unter optimalen Bedingungen (40°C) stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Feuchtigkeitsgehalt und die Temperatur des Streifens während der Versuchszeit konstant bleiben. Als Folge der Konstanz dieser beiden Faktoren resultiert ein konstant auf seinem Wert bleibender Elektrophoresestrom, der auf diese Weise dem Beginn der Gleichgewichtslage oder etwaige Änderungen anzeigt. Durch die Gleichgewichtslage ist eine ständig gleichbleibende Feuchtigkeitsströmung vom Aufdampfer über den Streifen zur Kühlfläche gegeben und der Elektrophoreseversuch kann über eine beliebig lange Zeit ausgedehnt werden.

Nach Beendigung des Versuches werden die Spannungsquellen für Elektrophoresekammer und Aufdampfer abgeschaltet und die Sicherheitshaube sowie der Kühler abgenommen. Nun wird der mäßig feuchte Streifen der Kammer entnommen, im Trockenschrank bei 30°C getrocknet und anschließend entwickelt.

Mit der beschriebenen Apparatur konnte die Auftrennung eines Aminosäure-Testgemisches (Essigsäure-Ameisensäure-Puffer pH 1,9; 1500 V; 25 V/cm; 7 mA; 3 Std. Heiztemp. 40°C; Kühltemp. -25°C), eines Chymotrypsinabbaus von Insulin (Essigsäure-Ameisensäure-Puffer pH 1,9; 1500 V; 25 V/cm; 7 mA 200 Min., Heiztemp. 40°C, Kühltemp. -25°C), eines Gemisches anorg. Ionen (Ca, Sr, Ba; Pyridin - Eisessig - $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{Citrat}$ -Puffer pH 5; 1500 V; 25 V/cm; 4,5 mA; 70 Min. Heiztemp. 40°C; Kühltemp. -25°C) sowie eines Zuckergemisches (Glukose, Rhamnose, Arabinose, Mannose; Borax-Puffer 0,06 m; 1100 V; 16 V/cm; 11 mA; 40 Min.; Heiztemp. 50°C; Kühltemp. -20°C) vorgenommen werden.

Da das Auftreten von Zonenimperfectionen weitgehend vermieden wird, besteht auch die Möglichkeit, die aufgetrennten Fraktionen nach dem Verfahren der Direktphotometrie auszuwerten.

Diskussion der Ergebnisse.

Das Hauptproblem der Hochspannungselektrophorese liegt in einer wirksamen Kühlung des Elektrophoresestreifens, um ein Austrocknen desselben zu verhindern. Bei den bisherigen Verfahren der direkten Kühlung des Streifens durch Festkörper oder Flüssigkeiten wurde eine Streifentemperatur von ca. $+ 5^{\circ}\text{C}$ angestrebt. Dabei erfolgte die Wärmeabfuhr hauptsächlich durch Leitung, im Falle der Kühlung mit Flüssigkeiten auch durch Konvektion. Bei beiden Verfahren besteht keine oder nur geringe Möglichkeit zur Verdunstung von Feuchtigkeit vom Streifen.

Das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene neue Prinzip macht von der Methode des freihängenden Streifens Gebrauch, um den Schwierigkeiten, die sich durch die unmittelbare Berührung des Streifens mit den angrenzenden Kühlphasen ergeben, aus dem Wege zu gehen. Insbesondere sollte damit das Auftreten von Zonenimperfectionen vermieden werden. Die Kühlung des Streifens erfolgt durch Strahlung und Konvektion; die Konvektion wird zusätzlich noch vergrößert durch mechanische Umwälzung der Atmosphäre zwischen Streifen und Kühler. Der Abstand des Kühlers vom Streifen ist möglichst gering gehalten (ca. 1 cm); eine weitere Verringerung dieses Abstandes ist wegen der im Laufe des Versuches auftretenden Eiskristallbildung nicht möglich. Da diese Kühlleistung natürlich hinter der der Kühlung durch Festkörper oder Flüssigkeiten zurückbleibt, tritt am Streifen nach Maßgabe des fließenden E-stromes eine Verdunstung der Pufferflüssigkeit auf. Um einer Austrocknung vorzubeugen, muß die abdampfende Feuchtigkeit durch neue ersetzt werden. Dies geschieht durch einen Aufdampfer der beschriebenen Art. Durch Ändern der Temperatur im Aufdampfer kann die produzierte Feuchtigkeitsmenge geändert werden. Bei geeigneter Aufdampftemperatur stellt sich so unter gegebenen Bedingungen (Ionenstärke des Puffers, Feldstärke, Streifenlänge) ein Gleichgewicht am Streifen ein, das hinsichtlich seiner Beschaffenheit dem der bisherigen Verfahren ähnelt, konstanter Elektrophoresestrom, konstante Streifentemperatur, konstante Streifenfeuchtigkeit.

Was zunächst die Streifenfeuchtigkeit anlangt, so kann diese variiert werden durch Variieren der Aufdampfertemperatur. Unter optimalen Bedingungen stellt sich eine Streifenfeuchtigkeit von

115 % ein. Diese Tatsache ist insofern von Interesse, als es sich gezeigt hat, daß die Diffusion der Zonen bei 100 bis 110 % ein Minimum einnimmt (26), was im Hinblick auf das Auftrennergebnis von Vorteil ist. Darüber hinaus kann im Gegensatz zu den früheren Verfahren der Hochspannungselektrophorese die Streifenfeuchtigkeit von 115 % auf etwa 150 % erhöht werden, was ev. für die Auftrennung von stark adsorbierbaren Substanzen von Wichtigkeit ist.

Bei den bisherigen Verfahren wurde teilweise mit Feldstärken bis 200 V/cm gearbeitet. Im allgemeinen kam man jedoch mit 40 bis 70 V/cm (Wieland; Werner-Westphal) aus. Bei dem neuen Prinzip liegt die obere Grenze der Feldstärke unter Zugrundelegung des Essigsäure-Ameisensäure-Puffers pH 1,9 und einer Streifenlänge von 40 bis 50 cm bei ca. 30 V/cm. Diese Grenze konnte auch durch Erhöhung der Aufdampfertemperatur nicht mehr hinaufgesetzt werden, da sich in zunehmendem Maße die Wärmestrahlung des Aufdampfers am Streifen bemerkbar macht, wodurch die Verdunstung steigt. Außerdem steigt zugleich auch die Temperatur der aufzudampfenden Flüssigkeit, was sich in der gleichen Weise äußert. Ein Variieren des Abstandes Streifen-Aufdampfer hat gezeigt, daß der Abstand möglichst klein gehalten werden muß, da sonst die Feuchtigkeit zu den kälteren Teilen des Systems (Kühler und Kammerwände) diffundiert und der Streifen austrocknet. Um einer Funkenbildung zwischen den beiden Stromkreisen zu entgehen, kann der Abstand nicht unter ca. 1 cm verringert werden. Eine Möglichkeit, die in dieser Arbeit nicht mehr experimentell geprüft wurde, ist die Verdampferoberfläche zu vergrößern, um damit bei gleicher niedriger Aufdampfertemperatur die Aufdampfmenge zu steigern. Ob es durch diese Maßnahme allerdings gelingt, die obere Grenze der Feldstärke zu erhöhen, ist fraglich, da eine gesteigerte Aufdampfmenge der Erscheinung des sog. lokalen Hitzekollapses, wie auch die durchgeführten Aufsprühversuche zeigen, keinen Einhalt zu bieten vermag. Infolge des lokalen Hitzekollapses trocknet der Streifen an einer Stelle scharf aus und die Elektrophorese ist damit unterbunden.

In enger Verbindung damit steht die Untersuchung der optimalen Streifenlänge. Bei den bisherigen Verfahren sind Trennwege bis 1 m gebräuchlich. Dabei kommt es, wie eigene Versuche zeigten,

mit steigender Streifenlänge allerdings zu Schwierigkeiten, da, um ausreichende Feldstärken zu erzielen, hohe Spannungen angelegt werden müssen, die zu Funkenbildung und ganz allgemein zu Störungen des Elektrophoreseablaufes Anlaß geben. Im allgemeinen wird deshalb auch nur eine Streifenlänge von 40 bis 60 cm bevorzugt.

Es hat sich gezeigt, daß bei dem neuen Prinzip bei Vergrößerung der Streifenlänge und bei Feldstärken, die denen bei Verwendung kürzerer Streifen entsprechen, der lokale Hitzekollaps auftritt. Mit steigender Streifenlänge sinkt die anzuwendende Feldstärke, während umgekehrt bei kürzeren Kammern relativ höhere Feldstärken angewandt werden können. Die Begrenzung der Streifenlänge auf 40 bis 50 cm stellt bei dem neuen Prinzip also einen Kompromiß dar. Durch das Experiment wurde festgestellt, daß unter dieser Bedingung die obere Grenze der Feldstärke bei ca. 30 V/cm liegt; bei weiterer Erhöhung der Feldstärke tritt wieder der lokale Hitzekollaps auf.

Es wurde versucht, die Kühlwirkung durch möglichst tiefe Kühlttemperaturen zu steigern. Entscheidende Erfolge waren selbst bei -30°C gegenüber -10°C nicht zu erzielen, so daß der größere apparative Aufwand nicht gerechtfertigt ist.

Die gemessene Streifentemperatur beträgt unter optimalen Bedingungen ca. 30° bis 40°C , das sind also 25° bis 35°C mehr als bei den bisherigen Verfahren ($+5^{\circ}\text{C}$). Diese Tatsache erweist sich einerseits als nachteilig, da ja die Diffusion der Zonen mit steigender Temperatur zunimmt. Auf der anderen Seite ist die erhöhte Streifentemperatur aber von Vorteil, da die aufgetragene Substanz rascher wandert. So zeigen z.B. die anorganischen Ionen H^{+} und Na^{+} bei einer Temperaturerhöhung von 5°C auf 35°C eine Zunahme der Ionenbeweglichkeit (für unendliche Verdünnung) um 60 bzw. 106 % (27). Diese Feststellung besagt aber, daß - im Vergleich zu den bisherigen Verfahren - die "effektive" Feldstärke des neuen Prinzips bei etwa 45 bis 60 V/cm liegt.

Die Unterbindung des Pufferzuges erfolgt bei dem Verfahren der Hochspannungselektrophorese mit Festkörperkühlung mittels Cellophanbarrieren. Da bei der neuen Methode auf Grund der Tatsache, daß von den nicht gekühlten Streifenenden ständig Pufferfeuchtig-

keit verdampft, durch den Puffersog keine Flüssigkeitsbewegungen im Streifen verursacht werden, sind hier die Cellophanbarrieren entbehrlich.

Es können auch mit der neuen Methode flüchtige sowie nichtflüchtige Puffer Anwendung finden; jeweils müssen nur die flüchtigen Pufferbestandteile aufgedampft werden. Je nach der Ionenstärke des verwendeten Puffers muß die anzuwendende Spannung so gewählt werden, daß bei einer Streifenbreite von ca. 10 cm der Elektrophoresestrom 10 mA nicht übersteigt. Dagegen liegt die Temperatur des Aufdampfers stets bei 40° bis 50°C.

Es wurde bereits mehrmals erwähnt, daß bei den bisherigen Verfahren der Hochspannungselektrophorese auf Grund des intimen Kontaktes des Streifens mit der Kühlphase die Entstehung von Zonenimperfektionen nicht zu vermeiden ist. Bei dem neuen Verfahren dagegen wandern die Zonen in dem völlig freihängenden Streifen ungestört. Die Folge ist, daß die Zonen nicht geschlängelt usw. erscheinen, sondern gerade bleiben, so daß bei diesem Verfahren die Möglichkeit zu einer quantitativen photometrischen Auswertung gegeben ist.

Zusammenfassung

Es wird über eine Hochspannungselektrophoresemethode berichtet, bei der auf Grund bekannter Nachteile der bisherigen Hochspannungselektrophoreseverfahren ein frei hängender Streifen Verwendung findet, der auf der einen Seite gekühlt, auf der anderen Seite, um Verdunstungsverluste auszugleichen, bedampft wird.

Es wurden mehrere Typen der beschriebenen Elektrophoresekammer auf ihre Eignung geprüft und einzelne Faktoren, wie Heiztemperatur, Kühltemperatur, Abstand Streifen-Aufdampfer, Puffer usw. untersucht, um die optimalen Bedingungen für die beste Trennleistung zu ermitteln.

Auf Grund von Leitfähigkeitsmessungen in Abhängigkeit von der Streifentemperatur, der Streifenfeuchtigkeit und vom Puffersog wird die Gleichgewichtslage (Konstanz von Elektrophoresestrom, Temperatur und Feuchtigkeit) diskutiert, die dann entsteht, wenn sich die abdampfende und aufgedampfte Feuchtmengemenge am

Streifen gerade die Waage halten.

Mittels einer Kammer, die nach dem Baukasten-Prinzip aufgebaut ist und die bei einer Trennstrecke von 50 cm die Durchführung von Elektrophoresen bei Feldstärken bis 30 V/cm gestattet, wird die Brauchbarkeit der Methode an einigen Beispielen der Trennung eines Aminosäuregemisches, eines Chymotrypsinabbaus von Insulin, eines Gemisches von anorg. Ionen (Ca, Sr, Ba) und von Zuckern dargestellt. Da mit Hilfe der neuen Methode keine Zonenimperfectionen auftreten, ist eine photometrische Auswertung der aufgetrennten Zonen möglich.

L i t e r a t u r

- 1 Michl H., Mh. Chem. 82, 489 (1951)
- 2 Spengler G.A., Knedel M., Klin. Wschr. 34, 389 (1956);
Heilmeyer L., Clotten R., Sano I., Sturm Jr. A., Lipp A.,
Klin. Wschr. 32, 831 (1954)
- 3 Scheffer F., Ziechmann W., Becker H., Schlüter H.,
Natw. 42, 71 (1955)
- 4 Markham R., Smith J.D., Nature 168, 406 (1951);
Markham R., Smith J.D., Biochem. J. 52, 552 (1952)
- 5 Kickhöfen B., Ciba Foundation Symposium S. 206 (1956)
- 6 Kraus K.A., Smith G.W., J. Am. Chem. Soc. 72, 4329 (1950);
Foster A.B., Chem. and Ind. 1050 (1952);
Werkheiser W.C., Winzler R.J., J. biol. Chem. 204, 971 (1953);
Crestfield A.M., Allen F.W., Analyt. Chem. 27, 422 (1955),
" " " " 27, 424 (1955);
Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Wieland Th., Pfeleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955)
- 7 Michl H., Mh. Chem. 83, 737 (1952);
Gross D., Nature 172, 908 (1953);
Gross D., Nature 173, 487 (1954)
- 8 Kraus K.A., Smith G.W., J. Am. Chem. Soc. 72, 4329 (1950)
- 9 Wieland Th., Pfeleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955)
- 10 Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955)
- 11 Michl H., Mh. Chem. 83, 737 (1952)
- 12 Michl H., Mh. Chem. 82, 489 (1951);
Kickhöfen B., Westphal O., Z. Naturforschg. 7b, 655 (1952);
Turba F., Esser H., Angew. Chem. 65, 256 (1953);
Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Wieland Th., Pfeleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955);
Gross D., Nature 176, 72 (1955);
Wieland Th., Schön W., Lieb. Ann. 593, 157 (1955);
Denuce J.M., Zuber H., Natforschg., 11b, 381 (1956);
Dose Kl., Caputo A., Bio. Z. 328, 376 (1956);

- zu 12 Gross D., Nature 178, 29 (1956);
Spengler G.A., Knedel M., Klin. Wschr. 34, 389 (1956)
- 13 Michl H., Mh. Chem. 82, 489 (1951);
Kickhöfen B., Westphal O., Z. Naturforschg. 7b, 655 (1952);
Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Wieland Th., Pfleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955);
Gross D., Nature 176, 72 (1955);
Turba F., Esser H., Bio. Z. 327, 93 (1955);
Sanger F., Thompson E.D.P., Kitai R., Biochem. J. 59, 509 (1955);
Ryle A.P., Sanger F., Smith L.F., Kitai R., Biochem. J. 60,
541 (1955);
Brown H., Sanger F., Kitai R., Biochem. J. 60, 556 (1955)
- 14 Heilmeyer L., Clotten R., Sano I., Sturm Jr. A., Lipp A.,
Klin. Wschr. 32, 831 (1954)
- 15 Markham R., Smith J.D., Nature 168, 406 (1951);
Markham R., Smith J.D., Biochem. J. 52, 552 (1952);
Werkheiser W.C., Winzler R.J., J. biol. Chem. 204, 971 (1953);
Turba F., Pelzer H., Schuster H., Z. physiol. Chem. 296, 97
(1954);
Turba F., Schuster H., Bio. Z. 325, 537 (1954);
Crestfield A.M., Allen F.W., Analyt. Chem. 27, 422 (1955);
" " " " 27, 424 (1955);
Lange G., Biochem. Z. 326, 172 (1955)
- 16 Michl H., Haberler F., Mh. Chem. 85, 779 (1954)
- 17 Schneider G., Sparmann G., Natw. 42, 156 (1955)
- 18 Michl H., Mh. Chem. 83, 737 (1952);
Foster A.B., J. Chem. Soc. 982, (1953);
Foster A.B., Stacey M., J. appl. Chem. 3, 19 (1953);
Gross D., Nature 172, 908 (1953);
Gross D., Nature 173, 487 (1954);
Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Fullner K.W., Northcote D.H., Biochem. J. 64, 657 (1956)
- 19 Michl H., Mh. Chem. 82, 489 (1951);
Gross D., Nature 178, 29 (1956);
Berbalk H., Schier O., Mh. Chem. 86, 146 (1955)

- 20 Michl H., Mh. Chem. 83, 737 (1952);
Berbalk H., Schier O., Mh. Chem. 86, 146 (1955)
- 21 Henschler D., Hoppe Seylers' 305, 34 (1956)
- 22 Sano I., Kayita H., Klin. Wschr. 33, 956 (1955)
- 23 Michl H., Mh. Chem. 82, 489 (1951);
Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Wieland Th., Pfeleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955);
Sansoni B., Baumgartner L., Z. anal. Chem. 158, 241 (1957)
- 24 Kickhöfen B., Ciba Foundation Symposium S. 206 (1956)
- 25 Michl H., Mh. Chem. 85, 1251 (1954);
Wieland Th., Pfeleiderer G., Angew. Chem. 67, 257 (1955)
- 26 Werner G., Westphal O., Angew. Chem. 67, 251 (1955);
Baumgartner L., Dipl. Arbeit, Univ. München 1956
- 27 D'Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker S. 1241

L e b e n s l a u f

Ich, Ludwig Baumgartner, wurde am 2.4.1928 in Weiden (Opf.) als Sohn des Kaufmanns Ludwig Baumgartner und seiner Ehefrau Susanna, geb. Riedl, geboren. Nach Besuch der Volksschule in Saal/Donau trat ich 1939 in das Neue Gymnasium in Regensburg über. Ab Januar 1944 diente ich als Luftwaffenhelfer und kam anschließend bis Kriegsende zum Arbeitsdienst. Bis zum Wiedergang der Oberschule im April 1946 war ich in der Stadtspar-
kasse in Kelheim und darauf in der elektromechanischen Werkstatt Dr. Mahlo in Saal/Do. beschäftigt. Im Juni 1948 legte ich die Reifeprüfung an der Oberschule für Jungen in Regensburg ab. Nach einer weiteren Tätigkeit bei der Fa. Dr. Mahlo begann ich im Sommersemester 1949 mit dem Chemiestudium an der Hochschule in Regensburg, wo ich im Mai 1952 mein Vorexamen ablegte. 1954 unterzog ich mich in München der Diplomchemikerhauptprüfung. Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Graßmann führte ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung von 1954 bis 1955 meine Diplomarbeit und von 1955 bis 1957 meine Dissertation "Untersuchungen zur Hochspannungselektrophorese" durch.

